

RECICLO DE CÉLULAS DE *ZYMO MONAS MOBILIS* EM SISTEMA COM MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO

Paola F. Forest¹, Mônica Girardi¹, Venina dos Santos², Carlos Bergman³, Mara Zeni^{2*},
Eloane Malvessi¹

¹ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, UCS – Caixa Postal 1352, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil (pfforest@ucs.br)

² Laboratório de Química de Materiais, Universidade de Caxias do Sul, UCS 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil (mzandrad@ucs.br)

³ Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais – PPGEM/UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Recibido: Mayo 2014; Aceptado: Junio 2014

RESUMO

Para aumentar o rendimento em biomassa e etanol por *Zymomonas mobilis*, tem sido relatado o emprego de técnicas de reciclo celular, com destaque para a utilização de membranas de microfiltração. O reciclo de células foi avaliado em sistemas de membranas cerâmica e poliméricas (fibras oca). *Z. mobilis* foi cultivada em reator de 0,5 litros e, ao final da batelada, o caldo fermentado foi introduzido nas membranas de microfiltração até seu esgotamento. Posteriormente, a biomassa foi re-circulada pelo reator, iniciando nova fermentação. O incremento médio de 38% na concentração celular foi atingido com o uso de membrana cerâmica e, por outro lado, devido à dificuldade de reciclo total, foi observada a queda, em termos de biomassa, com uso de membrana de fibras oca. Consequentemente, a maior conversão de substratos em células e em etanol foi atingida com membrana cerâmica, 0,045 e 0,47 respectivamente, sendo então, nas condições testadas, a alternativa mais indicada para este propósito.

Palavras clave: *Zymomonas mobilis*, reciclo de células, microfiltração, biomassa, membrana cerâmica, membrana polimérica

ABSTRACT

To increase the biomass yield and ethanol by *Zymomonas mobilis* has been reported employing cell recycle techniques, especially the use of microfiltration membranes. The recycling of cells has been reported in ceramic and polymeric membranes (hollow fiber) systems. *Z. mobilis* was grown in 0.5 liter reactor and at the end of the batch, the fermented broth was introduced in microfiltration membranes until exhausted. Then, the biomass was re-circulated through the reactor, starting new brew. The average increase of 38% in cell concentration was achieved using ceramic membranes and on the other hand, due to the difficulty of the total recycle, the decrease was observed in terms of biomass, using a hollow fiber membrane. Consequently, a higher conversion of substrates into cells and ethanol was achieved with ceramics, 0.045 and 0.47 respectively membrane, and then the conditions tested the alternative best suited for this purpose.

Key Words: *Zymomonas mobilis*, recycle mobile, microfiltration, biomass, ceramic membrane, polymeric membrane

INTRODUÇÃO

A *Zymomonas mobilis*, bactéria anaeróbia, Gram negativa, tem merecido destaque na produção de etanol em larga escala frente ao uso de leveduras por apresentar características como a tolerância a altas concentrações de açúcares e de etanol e relativa resistência a meios ácidos e contaminações. Como fontes de carbono para crescimento e produção de etanol, *Z. mobilis* utiliza glicose, frutose e sacarose, sendo que rendimento em etanol superior à 90% é obtido com o emprego de glicose como substrato (Swings & de Ley, 1977; Viikari, 1988; Fernandes, 2009).

Para a obtenção de células/enzimas e elevados teores de etanol por *Z. mobilis*, inicialmente, é conduzida a etapa fermentativa. Na sequência, o processo de separação/concentração das células microbianas pode ser realizado por centrifugação, filtração ou sedimentação. Tradicionalmente, em bioprocessos, é empregada a centrifugação, porém, técnicas alternativas tem sido foco de pesquisas (Coutinho, 2007). Devido à pequena dimensão das células bacterianas, que restringe o uso de centrífugas, abre-se a possibilidade do emprego de processos envolvendo membranas para a separação e concentração dos produtos da fermentação (Carminatti, 2001; Julbe et al., 2001; Carstensen et al., 2012). A principal característica que distingue estes processos de outras técnicas de separação é o uso de membranas seletivas em módulos compactos e em condições de baixo consumo de energia (Baker, 2004, Xu et al., 2005).

Nos processos de separação por membranas a força motriz é o gradiente de pressão, que tem uma analogia com a filtração convencional, em que a retenção por tamanho é o princípio básico de fracionamento das diferentes espécies químicas presentes (Mulder, 1996).

As membranas poliméricas apresentam uma vasta possibilidade de utilização além de características como flexibilidade e maleabilidade, porém o emprego de membranas cerâmicas na área de bioprocessos tem se destacado devido às características de resistência aos processos de esterilização, às altas condições de pressão, ao uso de agentes químicos e solventes orgânicos e ainda, como vantagem, a alta resistência mecânica (Mulder, 1996).

Entretanto, um problema associado ao uso de processos por separação de membranas é o denominado *fouling*, que compreende o conjunto de fatores capazes de reduzir o fluxo permeado com o tempo. Esse inconveniente pode ser devido ao bloqueio dos poros da membrana, adsorção de partículas na superfície da membrana e/ou formação de camada de gel. As características da membrana que se relacionam diretamente com a formação de *fouling* são a geometria da membrana, porosidade, rugosidade, material de confecção da mesma e hidrofobicidade (da Silva, 2009).

A polarização por concentração acontece devido à seletividade, que está intrínseca ao processo de filtração. Caracterizam-se pela concentração das espécies na superfície da membrana, sendo afetada pelas condições de escoamento da corrente de alimentação. À medida que a velocidade tangencial da alimentação aumenta, tende a diminuir a camada polarizada. A polarização por concentração é reversível e os fenômenos de incrustação como o *fouling* são parcial ou totalmente irreversíveis (Habert et al., 2006).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo conduzir os cultivos de *Z. mobilis* com posterior reciclo de células, através de módulo de membrana cerâmica tubular ou de membrana polimérica de fibras oca, visando ao aumento de produção de biomassa e rendimento em etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e condições de cultivo. A linhagem bacteriana usada neste estudo foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. O meio líquido utilizado para conservação, obtenção de inóculo e ensaios em biorreator continha em sua composição (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; KH_2PO_4 , 3,5; extrato de levedura bruto (*Prodex Lac[®]*, *Prodesa S.A, Brasil*), 7,5 (*Malvessi et al.*, 2006). No preparo do meio de ativação e conservação da cultura, foi adicionado 20 g/L de glicose e o pH ajustado para 5,5. Na obtenção de inóculo, a concentração de glicose utilizada foi de 100 g/L e o pH do meio foi controlado com a adição de CaCO_3 (5 g/L). Para os ensaios de fermentação em biorreator de 0,5 L de volume útil, foram empregadas concentrações de glicose 80 g/L. A esterilização de todos os meios foi feita em autoclave, a 1 atm, por 15 min.

Os cultivos foram realizados em regime descontínuo, a 30°C, pH controlado em 5,5 pela adição automática de NaOH 2,5 mol/L, mantido sob agitação magnética. Durante cerca de 20 minutos, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio de cultivo, à vazão de 0,5 L/min, com a finalidade de garantir a anaerobiose.

Reciclo de células através de membranas. Ao final de cada batelada, as células de *Z. mobilis* foram concentradas nas membranas e o permeado foi separado para posterior determinação de etanol. As células retidas nas membranas foram removidas pela passagem de água em fluxo invertido e reintroduzidas no reator, misturadas com o meio de fermentação. Ao final de cada batelada, o processo de concentração de células e separação de etanol foi reproduzido.

Os processos de microfiltração foram realizados com a utilização de membrana cerâmica de α -alumina, fornecida pela *Tecnicer-Cetebra* (*São Carlos/SP*), conformada na forma de tubo microporoso (tamanho médio de poros de 0,64 μm , área permeante de 0,01 m^2 , diâmetros interno de 8 mm e externo de 12 mm e 210 mm de comprimento), disposta em um módulo de aço inoxidável adaptado. A membrana polimérica de poli(éter imida), conformada na forma de fibras oca inseridas no tubo de poli(cloreto de vinila) (PVC) (tamanho médio de poros 0,4 μm , área permeante 0,027 m^2 , diâmetro 25 mm e comprimento útil 260 mm), foi fornecida por PAM Membranas Ltda. (*Rio de Janeiro/RJ*). A velocidade tangencial utilizada foi de $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$.

O sistema empregado no reciclo de células através de membranas foi composto de bomba de diafragma (*Shurflo*, modelo *Gold Series*, 24 VAC), manômetros e módulo de membrana, este último acoplado externamente ao reator.

Caracterização das membranas. As membranas foram caracterizadas através dos testes de microfiltração, determinando a compactação, permeabilidade à agua e ainda, no caso da membrana cerâmica, avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A quantificação do *fouling* e de polarização por concentração foi realizada por balanço de massa (*Manttari et al.*, 2006).

A membrana cerâmica foi submetida à limpeza em banho ultrassônico por 30 minutos, alternando a imersão em solução aquosa 0,5% (m/v) de ácido cítrico e 0,1 mol/L de hidróxido de sódio.

Metodologia analítica. A concentração celular foi determinada pela medida da absorbância, a 560 nm, em espectrofotômetro (*Aurora Instruments UV-210*). A concentração de açúcares redutores foi quantificada pelo método do ácido 3,5-di-nitro-salicílico-DNS (*Miller, 1959*). A quantificação do etanol do caldo de fermentação foi determinada, após a destilação, em equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (*Gibertini, Italy*).

Os parâmetros de avaliação foram a concentração celular final (X_f), o fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a condução dos testes com a membrana cerâmica, esta foi acondicionada dentro de um módulo, construído em aço inoxidável e adaptado externamente ao biorreator. O caldo a ser permeado era direcionado à bomba de diafragma e em seguida conduzido ao interior da membrana, onde escoava pela parte interna da mesma. O permeado, isento de células de *Z. mobilis*, escoava pela parte externa da membrana. O caldo não permeado retornava ao fermentador através da corrente do concentrado.

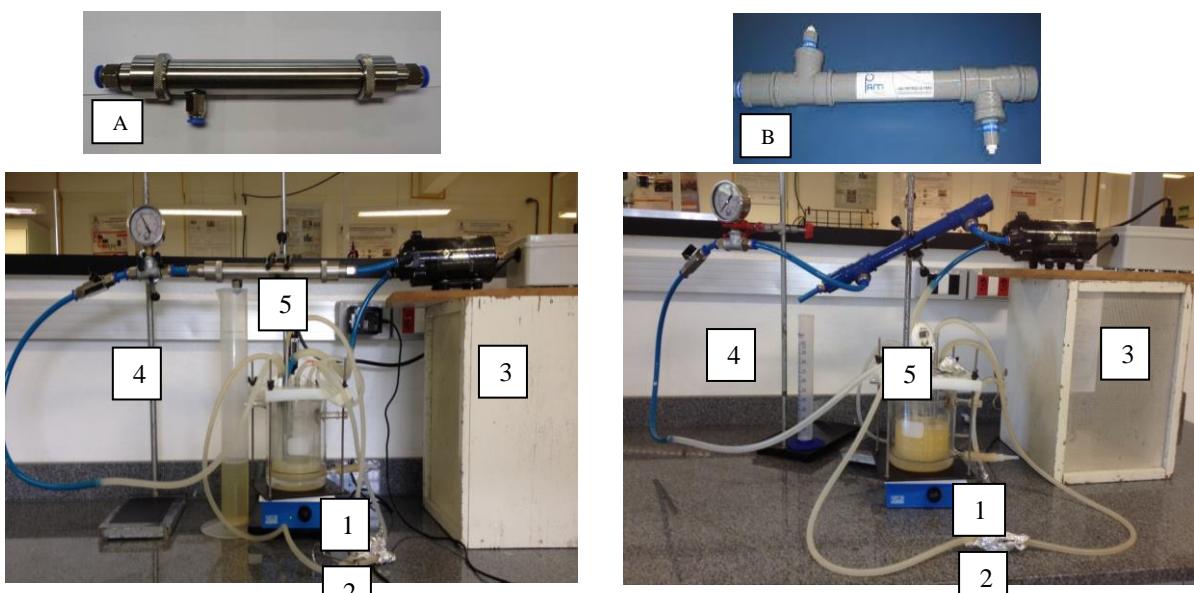


Figura 1. Sistemas empregados na concentração da biomassa e separação de etanol de *Zymomonas mobilis* através do módulo de membrana cerâmica (A) e poliméricas de fibras ovas (B). (1) reator; (2) agitador magnético; (3) bomba diafragma; (4) manômetro; (5) módulo de membrana.

Em relação às membranas poliméricas de fibras ovas, estas estavam acondicionadas em um módulo de PVC. Neste caso, a corrente de células entrava na parte externa das fibras ovas, escoando pela carcaça, e permeava axialmente pela membrana.

Na Figura 1 são apresentados os sistemas de membranas de microfiltração empregados nos testes de permeação e de reciclo de células de *Z. mobilis*.

Características das membranas. Nos testes de compactação, comportamento similar foi observado para ambos os tipos de membranas. O processo de permeação da água destilada iniciava com fluxo alto de permeado, que decrescia até valores constantes, comportamento esse indicativo da compactação das membranas. Em ambos os sistemas testados, o tempo de compactação foi semelhante, cerca de 3 horas, porém o fluxo permeado pela membrana cerâmica foi 2,5 vezes maior do que o obtido na membrana polimérica, possivelmente devido ao maior tamanho de poros da membrana cerâmica em comparação à membrana de fibras oca (Figura 2).

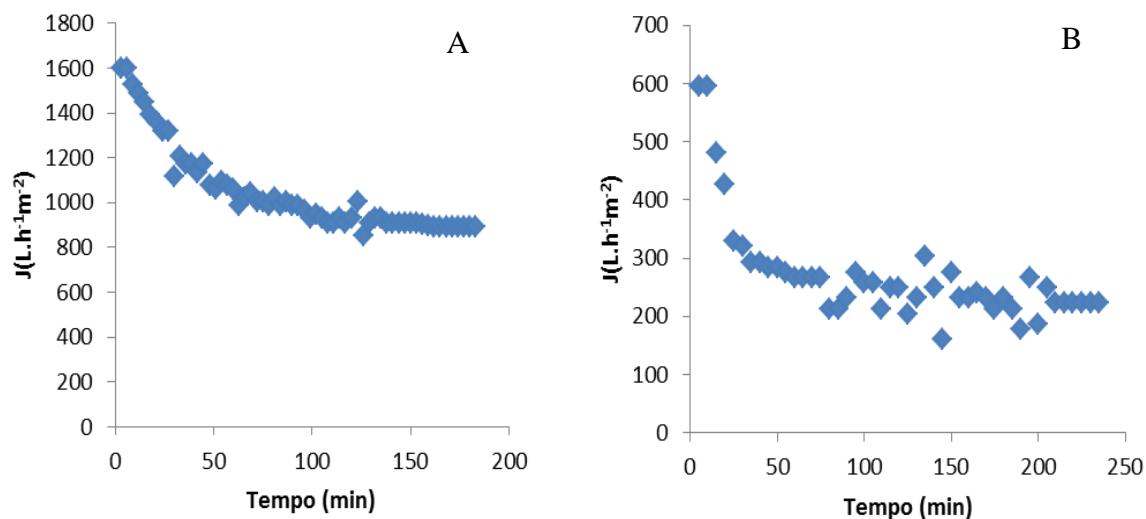


Figura 2. Compactação do módulo de membrana cerâmica tubular, à pressão de 6 bar (A) e do módulo de membrana polimérica de fibras oca, à pressão de operação de 3 bar (B).

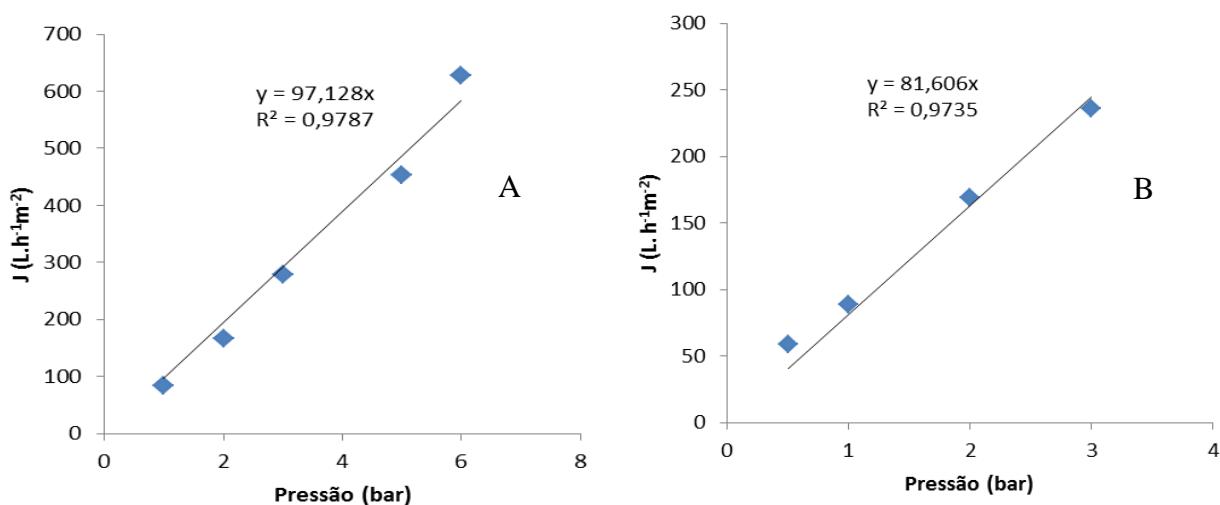


Figura 3. Permeabilidade hidráulica da membrana cerâmica tubular (A) e da membrana polimérica de fibras oca (B), relacionando os respectivos fluxos de permeado e pressões de operação.

A permeabilidade hidráulica foi determinada para ambas as membranas, a 25°C, sendo definida em função da declividade da reta, resultante da função gráfica entre o fluxo permeado (J) e a pressão de operação. Foi verificado o aumento da resistência proporcionalmente à pressão aplicada, independente do tipo de membrana utilizada (Figura 3).

Maior permeabilidade hidráulica foi atingida nos testes realizados com a membrana cerâmica quando comparado com a membrana polimérica, de 97,1 e 81,6 $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$, respectivamente, devido à maior porosidade da membrana cerâmica, permitindo assim maior passagem da água a ser permeada (Figura 3).

Em estudos de caracterização de membranas cerâmicas tubulares, *Diel et al.* (2010), relatam a obtenção de 99 e 186 $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$, respectivamente, para membranas cerâmicas de α -alumina de 0,1 e 0,4 μm de tamanho de poro. *Wallberg et al.* (2003), relatam a obtenção de valores de permeabilidade hidráulica para membranas cerâmicas, na ordem de 90 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Tais membranas foram usadas em experimentos de ultrafiltração e apresentavam massa molecular de corte de 15 KDa.

Fermentações com reciclo de células através de membranas cerâmicas. Em se tratando de utilização das membranas na etapa de reciclo de células e separação de etanol, inicialmente foi realizada a fermentação em biorreator e, ao final do processo, este foi permeado pela membrana cerâmica até o seu esgotamento. Posteriormente, as células retidas na membrana foram recirculadas para o interior do fermentador e o volume completado com o meio de cultura para dar início a uma nova batelada. Para o primeiro reciclo, o tempo de permeação na membrana foi de cerca de 3 h e para o segundo, de 4 h.

A compilação dos principais resultados é apresentada na Tabela 1. Nos cultivos visando ao reciclo de células através da membrana cerâmica foi observado o aumento médio de 48 e 51% na concentração celular no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente, estimada entre a primeira e a terceira batelada. Em termos de produto, foi observada, também, uma tendência de aumento de cerca de 10% entre os reciclos.

Tabela 1. Resultados gerais dos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* com reciclo de células através de membrana cerâmica tubular ($S_0 = 80 \text{ g/L}$, pH 5,5, a 30°C).

Bateladas	S_0 g/L	t^* h	X_f g/L	<i>Etanol</i> g/L	$Y_{X/S}$ g/g	$Y_{P/S}$ g/g	ρ $\%$
1	80,4	12	2,9	37,6	0,036	0,470	92
2	80,3	12	3,6	37,8	0,045	0,472	92
3	80,8	12	4,3	39,3	0,054	0,49	96

t – tempo final de cultivo; S_0 – concentração inicial de glicose; X_f – concentração celular final; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de glicose em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de glicose em etanol; ρ – rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,511 g/g).

A membrana cerâmica utilizada foi submetida aos testes de permeação com água antes e depois à sua utilização, com o objetivo foi verificar a completa remoção das células da membrana após a retrolavagem para o reciclo. Confrontando os valores de permeabilidade hidráulica da membrana pós-uso, foi constatada a redução de 62 e 76% após a primeira e segunda utilização da membrana, respectivamente, evidenciando, assim, a presença de células remanescentes na estrutura da membrana, que não foram removidas pela retrolavagem das mesmas.

O balanço de massa nos dois reciclos está apresentado na Tabela 2. Através desta determinação, foi possível realizar a quantificação das células de *Z. mobilis* que permaneceram aderidas na estrutura da membrana cerâmica. Em ambos os reciclos, 50% das células que permeiam através da membrana permaneceram aderidas à estrutura da mesma e não foram removidas pela passagem de água. Foi realizado o cálculo do percentual de *fouling*, cujos resultados representaram tendência ao *fouling* de cerca de 70 e 80% no primeiro e segundo reciclo, respectivamente, com a utilização da membrana cerâmica.

Tabela 2. Balanço de massa de células de *Zymomonas mobilis* em etapa de permeação pela membrana cerâmica.

Reciclos	M entra	M permeado	M concentrado	M acumulado
1	0,344 g/h	0	0,183 g/h	0,161 g/h
2	0,468 g/h	0	0,20 g/h	0,268 g/h

M entra – massa de células a ser permeada; M permeado – massa de células que permearam na membrana cerâmica; M concentrado – massa de células que retornaram ao fermentador após o ciclo de filtração; M acumulado – massa de células que ficaram impregnadas na membrana cerâmica.

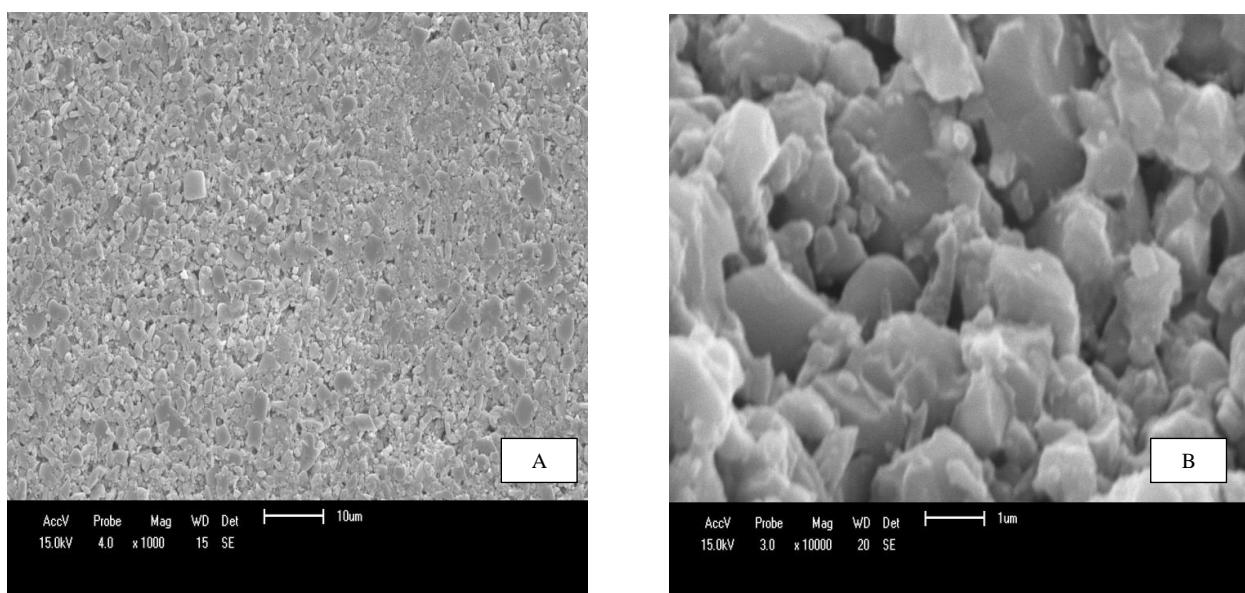


Figura 4. Micrografia (MEV) da superfície de membranas cerâmicas isenta de células de *Zymomonas mobilis*. Tamanho 1μm (A); 10μm (B), magnificação de 1000 e 10000x, respectivamente.

Fragmentos da membrana cerâmica foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura e comparados a fragmentos de membrana do mesmo lote de fabricação, não empregada nos processos de microfiltração. As imagens da microscopia são apresentadas em diferentes magnificações e ângulos. Nas Figura 4A e 4B pode ser observado o topo do fragmento de membrana onde se identificam os poros da camada filtrante da mesma, caracterizada pela assimetria, isto é, não se observa a regularidade em termos de tamanho dos poros apresentados na membrana cerâmica.

Nas Figura. 5A e 5B, observam-se a deposição das células de *Z. mobilis* sob a camada da membrana.

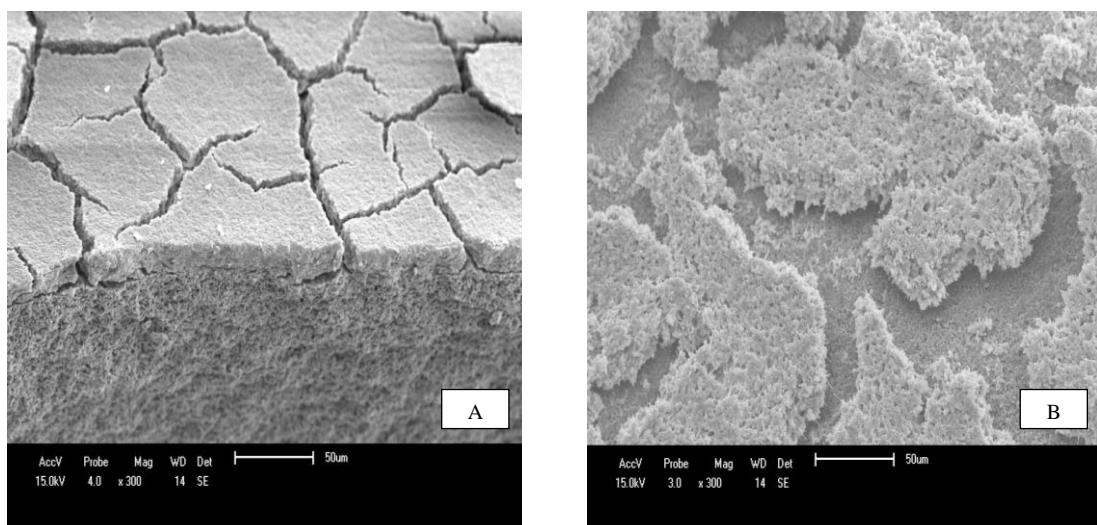


Figura 5. Micrografia (MEV) da camada de células de *Zymomonas mobilis* na membrana cerâmica. (A) vista lateral e (B) superfície (magnificação de 300 x).

Pode ser verificado que, devido ao diferente tamanho dos poros da membrana, algumas células apresentaram-se aprisionadas ou na forma de camada de células, comportamento observado nas Figuras 6A e 6B.

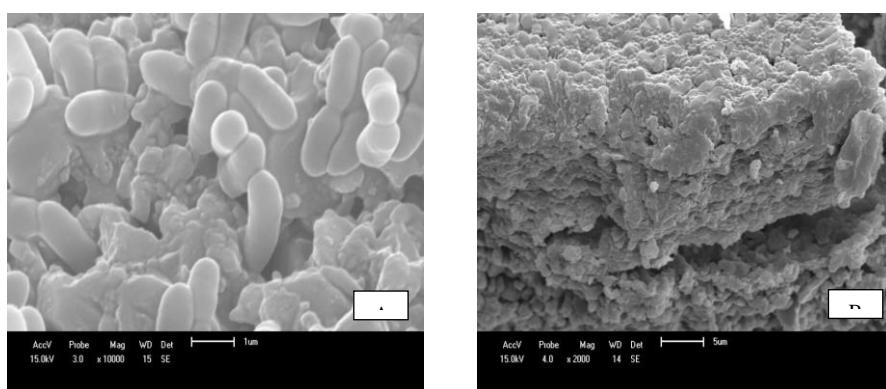


Figura 6. Micrografia (MEV) das células de *Zymomonas mobilis* em contato com a superfície da membrana cerâmica (A) superfície; (B) vista lateral (magnificação de 10.000 e 2.000 X).

Fermentação com reciclo de células através de membranas poliméricas. Assim como realizado com a membrana cerâmica, a etapa de reciclo com as membranas poliméricas foi antecedida pela condução de um cultivo de *Z. mobilis* para a obtenção de meio fermentado. Este foi permeado pela membrana até seu esgotamento, com velocidade de $1,5 \cdot 10^{-6}$ m/s e pressão de 2 bar. Posteriormente, as células foram recirculadas para o fermentador e o volume completado com o meio de cultura para iniciar uma nova batelada. O tempo de permeação foi de 3,3 horas para o primeiro reciclo e de 4,2 horas para o segundo reciclo.

Como pode ser observado na Tabela 3, não foi verificado o aumento da biomassa entre as bateladas e, como consequência, o mesmo foi revelado em termos de produção de etanol. Isto pode ter sido devido à retenção das células nas fibras constituintes da membrana, impedindo a recirculação para o fermentador e gerando, portanto, reciclo incompleto de células.

Tabela 3. Resultados gerais dos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* com reciclo de células através do módulo de membranas poliméricas ($S_0 = 80$ g/L, pH 5,5, a 30°C).

Bateladas	S_0 (g/L)	t (h)	X_f (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	ρ (%)
1	80,2	12	3,3	33,8	0,041	0,422	82
2	80,4	12	3,1	31,9	0,038	0,398	78
3	80,1	12	3,0	29,8	0,037	0,372	73

t – tempo final de cultivo; S_0 – concentração inicial de glicose; X_f – concentração celular final; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de glicose em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de glicose em etanol; ρ – rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,511 g/g).

O teste de permeabilidade hidráulica, realizado antes e depois das etapas de reciclo de células de *Z. mobilis* na membrana polimérica, apontou a redução de 37 e 69% no primeiro e segundo reciclo, respectivamente. Entretanto, a diminuição do fluxo após a passagem das células de *Z. mobilis* foi menos acentuada que a obtida com a membrana cerâmica, possivelmente devido à diferença do tamanho dos poros.

O balanço de massa do processo é apresentado na Tabela 4. Nos reciclos efetuados com as membranas poliméricas foi observado o acúmulo de cerca de 80% das células, isto é, 80% das células que permearam através das membranas permaneceram aderidas à estrutura das mesmas e não foram removidas pela passagem de água. Esse resultado comprova que, nas condições testadas, a estrutura das membranas poliméricas foi mais suscetível ao *fouling*, resultante da agregação das células de *Z. mobilis* do que a estrutura da membrana cerâmica.

Amaral et al. (2013) em estudos de filtração de efluente têxtil com membrana polimérica da PAM membranas de poli(imida), com tamanho de poro de 0,5 µm e área de 0,05 m², obteve valor de

permeabilidade de $127,6 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$. Os autores relatam a ocorrência de 75% de incrustações irreversíveis na membrana, além de retenção de 99% do efluente nas fibras da membrana, produzindo permeado com baixa concentração de sólidos.

Tabela 4. Balanço de massa de células de *Zymomonas mobilis* na permeação pelo módulo de membranas poliméricas.

Reciclos	M entra ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	M permeado	M concentrado	M acumulado
1	0,35 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$	0	0,06 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$	0,29 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$
2	0,32 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$	0	0,075 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$	0,24 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$

M entra – massa de células a ser permeada; M permeado – massa de células que permearam na membrana polimérica; M concentrado – massa de células que retornaram ao fermentador após o ciclo de filtração; M acumulado – massa de células que ficaram impregnadas na membrana polimérica.

Lee et al. (2013) em estudo sobre o *fouling* em membranas cerâmicas e poliméricas de microfiltração concluiu que existem diferenças críticas nestes processos de microfiltração. O *fouling* nas membranas poliméricas é mais irreversível que nas membranas cerâmicas, possivelmente devido a maior natureza hidrofílica das membranas cerâmicas. Os autores afirmam que a maior parte das incrustações verificadas em membranas poliméricas só pode ser removida por ação de limpezas químicas.

CONCLUSÕES

Com a utilização de membranas cerâmicas e poliméricas para a separação e concentração de células provenientes do cultivo de *Z. mobilis*, foi possível a obtenção do caldo permeado isento de células com ambas as técnicas de microfiltração, eliminando, assim, a etapa de *downstream*, tradicionalmente efetuada por centrífugas.

Foi verificado que o aumento da biomassa foi mais efetivo quando da utilização da membrana cerâmica. Esse fato pode ser explicado pela dificuldade de retirada das células concentradas nas membranas poliméricas, em função da estrutura de fibras ocas.

Através dos testes de balanço de massa e percentual de *fouling*, realizados para ambos os módulos, foi observado que incrustação presente na membrana cerâmica tubular foi predominantemente decorrente do *fouling* irreversível. Na utilização do módulo de membranas poliméricas de fibras ocas, a incrustação predominante foi decorrente de polarização.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PROCAD Casadinho – CNPq) e Universidade de Caxias do Sul (UCS) pelo apoio técnico e financeiro na realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- Amaral MCS, Andrade LH, Lange LC, Borges CP “Avaliação do emprego de microfiltração para remoção de fibras do efluente de branqueamento de polpa celulósica”. Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte, 18(1):65–74, 2013.
- BAKER, R. Membrane Technology and Applications. Wiley: John Wiley & Sons, 2004
- CARMINATTI, C. A. Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CARSTENSEN, F.; APEL, A.; WESSLING, M. In situ product recovery: submerged membranes vs. external loop membranes. Journal of Membrane Science, 394–395:1–36, 2012.
- COUTINHO FILHO, U. Engenharia Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Apostila.
- DA SILVA, M. Biorreatores com membranas: uma alternativa para o tratamento de efluentes. 2009. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- DIEL, J. L.; TESSARO, I. C.; MORCELLI, A. S.; CASSINI, A. S.; SILVA, M. K. Caracterização de membranas cerâmicas tubulares. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu, p.8211–8220.
- ERNANDES, F. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. 2009. 167 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Alimentos)–Faculdade de Engenharia e Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, São Paulo.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda. 3. ed, 2006, 180 p., (Série Escola Piloto em Engenharia Química COPPE/UFRJ). ISBN 85-7650-085-X.
- JULBE, A.; FARRUSSENG, D.; GUIZARD, C. Porous ceramic membranes for catalytic reactors – overview and new ideas. Journal of Membrane Science, 181:3–20, 2001.
- LEE, S. J.; DILAVER, M.; PARK, P. K.; KIM, J. H. Comparative analysis of fouling characteristics of ceramic and polymeric microfiltration membranes using filtration models. Journal of Membrane Science, Georgia, 432:97–105, 2013.
- MALVESSI, E.; CONCATTO, K.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49:139–144, 2006.
- MANTTARI, M.; VIITIKKO, K.; NYSTROM, M. Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry. Journal of Membrane Science, 152–160:1–2, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 31:426–428, 1959.
- MULDER, M. Basic Principles of Membrane Technology. 2. ed, 1996, 564 p. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. Bacteriological Reviews. 41:1–46, 1977.
- VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. Critical Reviews in Biotechnology, 7:237–261, 1988.
- WALLBERG, O.; JONSSON, A.; WIMMERSTEDT, R. Ultrafiltration of kraft black liquor with a ceramic membrane. Desalination, 145–153:1–3, 2003.